

特表平9-504695

(43)公表日 平成9年(1997)5月13日

(51)Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	
C 1 2 N 15/09		9162-4B	C 1 2 N 15/00	A
	9/38	8827-4B		9/38
G 0 1 N 33/535		0276-2J	G 0 1 N 33/535	
	33/542	0276-2J		33/542
				B
# (C 1 2 N 9/38				

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平7-513360	(71)出願人	ペーリンガー マンハイム コーポレーション
(86) (22)出願日	平成6年(1994)11月1日		ヨン
(85)翻訳文提出日	平成8年(1996)4月30日		アメリカ合衆国 48250 インディアナ州
(86)国際出願番号	P C T / U S 9 4 / 1 2 5 3 6		インディアナポリス, ヘイグ ロード
(87)国際公開番号	W O 9 5 / 1 2 6 6 7		9115番地 ビー, オー, ボックス 50528
(87)国際公開日	平成7年(1995)5月11日	(72)発明者	アイゼンバイス, スコット ジェイ,
(31)優先権主張番号	0 8 / 1 4 6, 6 7 3		アメリカ合衆国 48256 インディアナ州
(32)優先日	1993年11月1日		インディアナポリス, ウィンジャマー
(33)優先権主張国	米国 (U S)		エス, 10948番地
(81)指定国	EP (A T, B E, C H, D E, D K, E S, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E), C A, J P	(74)代理人	弁理士: 平木 祐輔 (外2名)
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 活性の増大したβ-ガラクトシダーゼ断片の突然変異タンパク質

## (57)【要約】

安定性の有意な低下なしに実質的に増大した速度論的相補性活性を示す、β-ガラクトシダーゼの酵素アクセプターポリペプチド断片の突然変異タンパク質を提供する。好ましい酵素アクセプター断片は天然配列の500位にシステイン以外のアミノ酸を有する。特に好ましい置換はセリンまたはバリンである。他の好ましい突然変異タンパク質は443位にメチオニン以外のアミノ酸(ロイシンが特に好ましい置換である)を、または76位にシステイン以外のアミノ酸(ロイシンが特に好ましい置換である)を有する。また、新規な突然変異タンパク質を生産する方法、新規な突然変異タンパク質を含有する試薬組成物、および新規な突然変異タンパク質を酵素ドナーポリペプチド断片と再会合させて酵素活性β-ガラクトシダーゼを形成させることを含むアナライズ定量的ためのイムノアッセイ法を提供する。

【特許請求の範囲】

1. 500位にシステイン以外のアミノ酸を有するβ-ガラクトシダーゼの酵素アクセプターポリペプチドの突然変異タンパク質。
2. 前記のアミノ酸がグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニンおよびメチオニンより成る群から選ばれる、請求項1に記載の突然変異タンパク質。
3. 前記のアミノ酸がセリンまたはバリンである、請求項1に記載の突然変異タンパク質。
4. 443位にメチオニン以外のアミノ酸を有するβ-ガラクトシダーゼの酵素アクセプターポリペプチドの突然変異タンパク質。
5. 前記のアミノ酸がグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリンおよびトレオニンより成る群から選ばれる、請求項4に記載の突然変異タンパク質。
6. 前記のアミノ酸がロイシンである、請求項4に記載の突然変異タンパク質。
7. 76位にシステイン以外のアミノ酸を有するβ-ガラクトシダーゼの酵素アクセプターポリペプチドの突然変異タンパク質。
8. 前記のアミノ酸がグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニンおよびメチオニンより成る群から選ばれる、請求項7に記載の突然変異タンパク質。
9. 前記のアミノ酸がロイシンまたはセリンである、請求項7に記載の突然変異タンパク質。
10. β-ガラクトシダーゼの酵素アクセプターポリペプチドの突然変異タンパク質を生産する方法であって、β-ガラクトシダーゼの酵素アクセプターポリペプチドをコードするプラスミドを処理して部位特異的突然変異誘発によりβ-ガラクトシダーゼのアミノ酸500（通常はシステインである）をコードする該プラスミドの部分に突然変異を起こさせ、該プラスミドを発現させて上記の突然変異タンパク質を生産させることを含んでなる方法。
11. 前記の部位特異的突然変異誘発がアミノ酸500のシステインをコードする

部分にグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニンおよびメチオニンより成る群から選ばれるアミノ酸をコードするための突然変異を導入することを含む、請求項10に記載の方法。

12. 前記の部位特異的突然変異誘発がアミノ酸500のシステインをコードする部分にバリンまたはセリンをコードするための突然変異を導入することを含む、請求項10に記載の方法。

13.  $\beta$ -ガラクトシダーゼの酵素アクセプターポリペプチドの突然変異タンパク質を生産する方法であって、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの酵素アクセプターポリペプチドをコードするプラスミドを処理して部位特異的突然変異誘発により $\beta$ -ガラクトシダーゼのアミノ酸443（通常はメチオニンである）をコードする該プラスミドの部分に突然変異を起こさせ、該プラスミドを発現させて上記の突然変異タンパク質を生産させることを含んでなる方法。

14. 前記の部位特異的突然変異誘発がアミノ酸443のメチオニンをコードする部分にグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリンおよびトレオニンより成る群から選ばれるアミノ酸をコードするための突然変異を導入することを含む、請求項13に記載の方法。

15. 前記の部位特異的突然変異誘発がアミノ酸443のメチオニンをコードする部分にロイシンをコードするための突然変異を導入することを含む、請求項13に記載の方法。

16.  $\beta$ -ガラクトシダーゼの酵素アクセプターポリペプチドの突然変異タンパク質を生産する方法であって、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの酵素アクセプターポリペプチドをコードするプラスミドを処理して部位特異的突然変異誘発により $\beta$ -ガラクトシダーゼのアミノ酸76（通常はシステインである）をコードする該プラスミドの部分に突然変異を起こさせ、該プラスミドを発現させて上記の突然変異タンパク質を生産させることを含んでなる方法。

17. 前記の部位特異的突然変異誘発がアミノ酸76のシステインをコードする部分にグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニンおよびメチオニンより成る群から選ばれるアミノ酸をコードするための突然変異を導入することを含む、請求項16に記載の方法。

18. 前記の部位特異的突然変異誘発がアミノ酸76のシステインをコードする部分にロイシンまたはセリンをコードするための突然変異を導入することを含む、請求項16に記載の方法。
19. 500位にシステイン以外のアミノ酸を有するβ-ガラクトシダーゼの酵素アクセプターポリペプチドを含有する試薬組成物。
20. 前記のアミノ酸がグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニンおよびメチオニンより成る群から選ばれる、請求項19に記載の試薬組成物。
21. 前記のアミノ酸がバリンまたはセリンである、請求項19に記載の試薬組成物。
22. 443位にメチオニン以外のアミノ酸を有するβ-ガラクトシダーゼの酵素アクセプターポリペプチドを含有する試薬組成物。
23. 前記のアミノ酸がグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリンおよびトレオニンより成る群から選ばれる、請求項22に記載の試薬組成物。
24. 前記のアミノ酸がロイシンである、請求項22に記載の試薬組成物。
25. 76位にシステイン以外のアミノ酸を有するβ-ガラクトシダーゼの酵素アクセプターポリペプチドを含有する試薬組成物。
26. 前記のアミノ酸がグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニンおよびメチオニンより成る群から選ばれる、請求項25に記載の試薬組成物。
27. 前記のアミノ酸がロイシンまたはセリンである、請求項25に記載の試薬組成物。
28. アナライトを含んでいると予想されるサンプル中のアナライトを定量するためのイムノアッセイ法であって、
- (a) 該サンプルを次の成分：
- (i) 酵素ドナーポリペプチド結合体；
  - (ii) 該アナライトに特異的なアナライト結合性タンパク質；
  - (iii) β-ガラクトシダーゼの断片から本質的に成る酵素アクセプター

ポリペプチド（該酵素アクセプターポリペプチドは、上記の結合体に

結合するアナライト結合性タンパク質の不在下で、酵素ドナーポリペプチドと一緒にβ-ガラクトシダーゼ活性を有する活性酵素複合体を形成する点に特徴があり、さらに該酵素アクセプターポリペプチドは500位にシステイン以外のアミノ酸を有する点に特徴がある）；および

(iv) 上記の活性酵素複合体と反応しうる基質（その結果、該活性酵素複合体による該基質の変換速度をモニターすることができ、また、上記の酵素ドナー結合体はアナライト結合性タンパク質に競合的に結合することができ、それにより活性酵素複合体の形成を阻止する）；と接触させ、

(b) 基質の変換速度を測定し、そして

(c) 上記の基質の変換速度を既知濃度のアナライトを用いて得られた基質の変換速度と比較することによりサンプル中のアナライトの量を定量する、ことを含んでなる方法。

29. 前記のアミノ酸がグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニンおよびメチオニンより成る群から選ばれる、請求項28に記載の方法。

30. 前記のアミノ酸がセリンまたはバリンである、請求項28に記載の方法。

31. アナライトを含んでいると予想されるサンプル中のアナライトを定量するためのイムノアッセイ法であって、

(a) 該サンプルを次の成分：

(i) 酵素ドナーポリペプチド結合体；

(ii) 該アナライトに特異的なアナライト結合性タンパク質；

(iii) β-ガラクトシダーゼの断片から本質的に成る酵素アクセプターポリペプチド（該酵素アクセプターポリペプチドは、上記の結合体に結合するアナライト結合性タンパク質の不在下で、酵素ドナーポリペプチドと一緒にβ-ガラクトシダーゼ活性を有する活性酵素複合体を形成する点に特徴があり、さらに該酵素アクセプターポリペプチドは443位にメチオニン以外のアミノ酸

を有する点に特

徴がある) ; および

(iv) 上記の活性酵素複合体と反応しうる基質 (その結果、該活性酵素複合体による該基質の変換速度をモニターすることができ、また、上記の酵素ドナー結合体はアナライト結合性タンパク質に競合的に結合することができ、それにより活性酵素複合体の形成を阻止する) ;

と接触させ、

(b) 基質の変換速度を測定し、そして

(c) 上記の基質の変換速度を既知濃度のアナライトを用いて得られた基質の変換速度と比較することによりサンプル中のアナライトの量を定量する、ことを含んでなる方法。

32. 前記のアミノ酸がグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリンおよびトレオニンより成る群から選ばれる、請求項31に記載の方法。

33. 前記のアミノ酸がロイシンである、請求項請求項31に記載の方法。

34. アナライトを含んでいると予想されるサンプル中のアナライトを定量するためのイムノアッセイ法であって、

(a) 該サンプルを次の成分:

(i) 酵素ドナーポリペプチド結合体;

(ii) 該アナライトに特異的なアナライト結合性タンパク質;

(iii)  $\beta$ -ガラクトシダーゼの断片から本質的に成る酵素アクセプターポリペプチド (該酵素アクセプターポリペプチドは、上記の結合体に結合するアナライト結合性タンパク質の不在下で、酵素ドナーポリペプチドと一緒に成る $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を有する活性酵素複合体を形成する点に特徴があり、さらに該酵素アクセプターポリペプチドは76位にシステイン以外のアミノ酸を有する点に特徴がある) ; および

(iv) 上記の活性酵素複合体と反応しうる基質 (その結果、該活性酵素複合体による該基質の変換速度をモニターすることができ、また、上記の酵素ドナー結合体はアナライト結合性タンパク質に競合的に結合することができ、それ

により活性酵素複合体の形成を阻止する)；

と接触させ、

(b) 基質の変換速度を測定し、そして

(c) 上記の基質の変換速度を既知濃度のアナライトを用いて得られた基質の変換速度と比較することによりサンプル中のアナライトの量を定量する、ことを含んでなる方法。

35. 前記のアミノ酸がグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニンおよびメチオニンより成る群から選ばれる、請求項34に記載の方法。

36. 前記のアミノ酸がロイシンまたはセリンである、請求項34に記載の方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 活性の増大した $\beta$ -ガラクトシダーゼ断片の突然変異タンパク質

#### 背景

本発明は、増大した活性を有する $\beta$ -ガラクトシダーゼの修飾された酵素アクセプターポリペプチド断片、その生産方法ならびに酵素相補性イムノアッセイにおける試薬としてのその使用に関するものである。

近年、血清のようなサンプル中に存在しうるアナライト（測定対象物質）の定量に利用できる検出可能なシグナルを発生させるステップとして、酵素的に不活性のポリペプチド断片同士の相補性(complementation)または再会合(reassociation)を用いて活性型酵素を生成させる均一系のイムノアッセイが数多く記述されている。こうしたアッセイのいくつかは相補性により生成される酵素として $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素を利用することを提案している。

酵素相補性には2以上の不活性ポリペプチドの会合が必要となり、これらのポリペプチドが一緒になって生物活性酵素の形成に必要とされる構造的情報（天然の親酵素のものに似通っている）を提供する。酵素的に不活性のポリペプチド断片は、タンパク質分解、化学的開裂、化学的合成の結果として、あるいは活性酵素をコードしている遺伝子のミスセンスまたはナンセンス突然変異の結果として得ることができる。酵素的に活性のある複合体を生成するタンパク質相補系の例としては、リボヌクレアーゼS' 複合体、ブドウ球菌ヌクレアーゼT 複合体、シトクロムc から誘導される種々の2-および3-断片複合体、そして大腸菌 $\beta$ -ガラクトシダーゼの $\alpha$ および $\omega$ 相補性複合体が挙げられる。こうした複合体を安定化する相互作用は非共有結合的であって、天然酵素の三次元構造の形成および維持に係わっているものに似ている。

酵素相補性は新規な均一系イムノアッセイ法の開発のための基本的原理として利用されてきた。FarinaおよびGolke の米国特許第4,378,428号（1983年3月29日発行）およびGonelliら(1981, Biochem. and Biophys. Res. Commun. 102:917-923)は、リボヌクレアーゼの触媒活性を生成させるためのS-ペプチドおよび

Sタンパク質（両方ともリボヌクレアーゼAのタンパク質分解切断により得られ



る)の再会合に基づくイムノアッセイを記述している。このアッセイ系に特有の成分としては、Sペプチド(アミノ酸1-20)に共有結合されたアナライト、遊離のSタンパク質(アミノ酸21-124)、アナライトに特異的な抗体、およびリポーター分子に変換され得るリボヌクレアーゼの基質が含まれる。抗アナライト抗体がアナライト:Sペプチド結合体とSタンパク質との会合を阻止し、その結果、酵素的に活性のある複合体のレベル、ひいては酵素反応により生じるシグナルを減少させる。遊離のアナライトを含有するサンプルの存在下では、サンプル由来のアナライトとSペプチド結合体との間で抗原結合部位についての競合が起こる。Sタンパク質断片との相補に關与しないSペプチド結合体の濃度、およびリボヌクレアーゼA'複合体の酵素活性により発生するシグナルが、サンプル中の遊離アナライトの濃度に直接比例することとなる。

大腸菌β-ガラクトシダーゼポリペプチド断片のα相補性系に基づく同様のイムノアッセイ系が、Hendersonの米国特許第4,708,929号(1987年11月24日発行)およびHendersonのPCT出願第PCT/US90/02491号(1990年11月15日公開)に記載されており、これらの開示内容を参考としてここに組み入れる。β-ガラクトシダーゼのα相補性はαアクセプターポリペプチド断片とαドナーポリペプチド断片との会合、およびその後の活性β-ガラクトシダーゼ分子の形成を必要とする。αアクセプターはβ-ガラクトシダーゼ分子のN末端近位セグメント内に位置する連続アミノ酸の内部欠失または鎖切断から誘導される。特定の例としては、野生型配列の残基11-41を欠失しているlacZ M15β-ガラクトシダーゼ欠失変異体および残基23-31を欠失しているlacZ M112変異体が挙げられる。αドナーポリペプチドは野生型タンパク質の化学的開裂またはタンパク質分解切断から誘導され得る。アミノ酸残基3-92から成る臭化シアン断片CNBr2および残基3-40にわたるV8プロテアーゼペプチドは、双方ともαドナー活性を有している。

また、αドナーおよびαアクセプターポリペプチドは組換えDNA法やペプチド合成法の使用によっても得ることができる。これらの分子の供給物を容易に入手でき、さらに、こうした技法によってαドナーまたはαアクセプターポリペプ

チドの構造を修飾できるため、最適化された相補性系が開発されるようになり、クローン化酵素ドナーに基づく均一系イムノアッセイにおいて使用されている。 $\alpha$ ドナー分子はこの分子の配列内に適切に配置されたシステインまたはリシン残基の修飾により特定アナライトと化学的に結合させることができ、しかも、こうした結合が相補反応を妨害しないようにすることができる。 $\alpha$ アクセプターと $\alpha$ ドナー間の相補性は、アナライト特異的抗体と $\alpha$ ドナー（アナライトを結合させてある）との抗原-抗体反応によって変調され得る。遊離のアナライトの存在下においては、遊離のアナライトと $\alpha$ ドナー結合アナライトとの競合が上記抗体の抗原結合部位について起こる。それゆえ、遊離アナライトのレベルが増加すると、 $\alpha$ アクセプターとの相補反応に利用しうる $\alpha$ ドナー結合体の量が増えることとなる。その結果、 $\alpha$ アクセプター： $\alpha$ ドナー複合体の濃度および再構成された酵素活性から生じるリポーター分子の濃度が増加し、これらはサンプル中に存在する遊離アナライトの濃度に比例している。遊離アナライトのさまざまな濃度における活性（すなわち、反応速度の勾配）をモニターすることにより用量反応曲線を作成することが可能である。無限濃度の遊離アナライトの存在下でまたは抗体の不在下で観測された酵素活性が「開放速度（open rate）」として規定され、そのアッセイ系から得ることのできる最大シグナルを表している。

KrevolinおよびKates の欧州特許出願第92304354.1号（1992年11月19日公開；その開示内容を参考としてここに組み入れる）は酵素相補性アッセイを記述しており、このアッセイは $\beta$ -ガラクトシダーゼの $\omega$ 領域の一次構造の破壊により形成された全 $\beta$ -ガラクトシダーゼ分子の2つのポリペプチド断片間の $\beta$ -ガラクトシダーゼの $\omega$ 領域における相補性を用いている。 $\alpha$ 相補性の場合と同様に、いくつかの場合には、2つの断片はギャップ（間隙）やオーバーラップ（重なり部分）のない正確な $\beta$ -ガラクトシダーゼのアミノ酸配列を形成するように厳密に相補性である必要はない。得られる断片が活性型の $\beta$ -ガラクトシダーゼ分子へと組み立てられるのであれば、ギャップもオーバーラップも存在可能である。 $\alpha$ アクセプターと同じく、 $\omega$ アクセプターポリペプチドは2つの断片のうちの大きい方であり、通常、天然型または修飾型の全長 $\beta$ -ガラクトシダーゼのアミノ酸配列のほぼ3分の2を含んでいる。 $\omega$ ドナー分子は残りのおよそ3分の1のアミ

ノ酸配列を含む小さい方の断片であり、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ分子のC末端から誘導される。

$\beta$ -ガラクトシダーゼは分子量約 540,000ダルトンの四量体タンパク質である。4つの同一の単量体が1023個のアミノ酸から成り、それぞれ116,000 ダルトンの分子量を有する。単量体タンパク質は3つの領域、すなわちN末端近位セグメント ( $\alpha$  領域)、中間領域およびC末端遠位セグメント ( $\omega$  領域)、に分割される。

大腸菌の $\beta$ -ガラクトシダーゼは1 a c オペロンの $\gamma$  遺伝子から誘導されるもので、 $\beta$ -D-ガラクトピラノシドの加水分解を触媒する。この酵素の触媒機構はゼロシン-503による基質分子のグリコシドエステル結合の一般的酸触媒作用を伴う。これに続いてアグリコン部分の損失およびグルタミン酸-461との相互作用による推定上のカルボニウムイオン中間体の安定化が起こる。触媒同期の最終段階は、アクセプター分子（通常は水）のトランスガラクトシル化および活性部位からの生成物の解離を伴う。活性酵素は4つの同じサブユニットから構成されており、サブユニットにつき1つの活性部位がある。1 価のカチオンは、活性にとって必要ではないが、酵素触媒作用の速度を劇的に高め、一方、2 価のカチオン（例えば、 $Mg^{2+}$ または $Mn^{2+}$ ）は活性にとって必要である。

大腸菌の $\beta$ -ガラクトシダーゼホモ四量体は64個のシステイン残基（サブユニットあたり16個のシステイン残基）を含み、これらはいずれも酵素活性に関係しておらず、また、高濃度の還元剤の存在下でこの分子が安定していることにより示されるように、サブユニット間のジスルフィド橋による四次構造の維持にも関わっていない。活性四量体を形成させるための個々の単量体のin vitro会合の効率は、システインが完全に還元される条件下で劇的に増加する。同様に、還元剤は酵素相補性を大幅に高める。 $\alpha$ アクセプターポリペプチドは単一の $\beta$ -ガラクトシダーゼサブユニット中に存在する16個すべてのシステイン残基を含んでいる。しかし、 $\alpha$ アクセプター分子は溶液中ではホモ二量体として存在している。こうして、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの二量体-二量体界面に通常埋め込まれる表面領域は $\alpha$ アクセプターにおいて露出されている。ヨード酢酸を用いた $\beta$ -ガラクトシダーゼの化学的修飾実験により、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ中の表面接近可

(Jornvall ら, 1978, Biochem. 17, 5160-64)。これら2つの残基のカルボキシメチル化は酵素活性に対してどのような有意な程度にも影響を与えなかった。ところが、二量体の $\alpha$ アクセプター分子であるM15をヨード酢酸で処理したときには、78位、389位および602位の3つの追加のシステイン残基が修飾された。カルボキシメチル化は $\alpha$ 相補性に関与するM15の能力を阻害することが分かった。このことは、これらの追加の残基の1以上が二量体-二量体界面に位置していて、その修飾が $\alpha$ 相補性を妨げることを示唆している。

本発明において、まったく予期せざることに、ある種のアミノ酸残基の修飾は酵素活性を顕著に増大させることが見いだされた。この活性増加は、相補性活性すなわち触媒的に不活性のドナーおよびアクセプター二量体が組み合わされて触媒活性のある $\beta$ -ガラクトシダーゼ四量体を形成する速度に関してだけでなく、平衡活性すなわち再形成された $\beta$ -ガラクトシダーゼ四量体が基質を変換する速度に関しても生じた。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の増加によりアナライトについてのアッセイ感度が向上し、こうした感度の向上はごくわずかな量で血清中に存在するアナライト（例えば、薬剤および薬剤代謝産物）をより正確に検出できることを意味する。本発明の突然変異タンパク質を用いると、酵素の安定性の有意な低下なしにアッセイ感度が1.3倍ないし3倍またはそれ以上増加する。

システイン残基をセリンに変換するtRNAシンテターゼの予め決められた部位特異的突然変異誘発が報告されている(G. Winterら, 1982, Nature, 299, 756-758およびA. Wilkinsonら, 1984, Nature, 307, 187-188)。Estellらの米国特許第4,760,025号(1988年7月26日発行)は、いくつかのメチオニン残基のアミノ酸置換を起こさせるように特定部位で修飾されたクロン化ズブチリシン遺伝子を記述している。Kothsらの米国特許第4,752,585号(1988年6月21日発行)および同第5,116,943号(1992年5月26日発行)は、インターロイキン-2またはインターフェロン- $\beta$ のような治療用タンパク質を酸化から保護するために、クロロミンTまたは過酸化化物による酸化を受けやすいメチオニル残基を同様のアミノ酸で置換することを記述している。

Buchwalterらの欧州特許出願第91106224.8号（1991年11月27日公開）は、部位特異的突然変異誘発法によっていくつかのセリンおよびチロシン残基をシステイ

ン残基で置換し、そしていくつかのシステイン残基をグルタミン酸で置換した動物のソマトトロピン誘導体を記述している。Breddam らのPCT/DK91/00103（1991年10月31日公開）は化学的に修飾されたデタージェント酵素を記述しており、ここでは1個以上のメチオニンをシステインに突然変異誘発させ、その後システインを化学的に修飾して酸化剤に対する該酵素の安定性を向上させている。Mattesらの米国特許第4,963,469号（1990年10月16日発行）は、 $\beta$ -ガラクトシダーゼのアミノ酸430-550の領域内のあるアミノ酸を他のアミノ酸に変えて、酵素的に不活性であるが免疫学的には活性のある $\beta$ -ガラクトシダーゼ突然変異タンパク質を得ることを記述している。Estellら（1985, J. Biol. Chem. 260, 6518-6521）はズブチリシンのメチオニン222残基（この酵素の酸化的不活性化のための主要な部位である）を変えるために部位特異的突然変異誘発を採用した。これらの著者は、非酸化性アミノ酸（すなわち、セリン、アラニンおよびロイシン）を含む変異体が過酸化物による不活性化に抵抗するが、メチオニンおよびシステインで置換された酵素は急速に失活されることを見いだした。

共通に譲渡された継続中の米国特許出願第08/111,248号（1993年8月24日出願；その開示内容を参考としてここに組み入れる）において、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの酵素アクセプターポリペプチド断片上のシステイン-602残基の部位特異的突然変異誘発による同類アミノ酸（好ましくはセリン）置換は、602位にシステインを有する酵素アクセプターポリペプチド断片の安定性と比べて、酵素アクセプター突然変異タンパク質の安定性を実質的に向上させることが見いだされた。

ここで用いる $\beta$ -ガラクトシダーゼのアミノ酸残基の番号付けは、Kalnins ら, 1983, EMBO Journal 2, 593-597 に発表されたものであり、その開示内容を参考としてここに組み入れる。大腸菌の $\beta$ -ガラクトシダーゼをコードする lacZ 遺伝子のスクレオチド配列が決定され、 $\beta$ -ガラクトシダーゼは Fowler および Zabin (1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA74, 1507-1510および1978, J. Biol.

Chem. 253, 5521-5525) により以前に報告された1021アミノ酸残基ではなく1023アミノ酸残基から成ると予測された。

#### 発明の概要

本発明は、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの酵素アクセプターポリペプチド断片の新規な突然変異タンパク質ならびに該突然変異タンパク質の生産方法を提供する。特に、本発明は、次の部位、すなわちシステイン-500、メチオニン-443およびシステイン-76のうちの少なくとも1つの部位にアミノ酸置換を有する新規な酵素アクセプター断片を提供する。本発明のある実施態様では、500位にシステイン以外のアミノ酸が存在する $\beta$ -ガラクトシダーゼの酵素アクセプターポリペプチド断片の新規な突然変異タンパク質が提供される。特に好ましいものはシステイン-500をセリンまたはバリンで置換してある $\beta$ -ガラクトシダーゼの $\alpha$ アクセプターポリペプチド断片である。

別の実施態様において、本発明はまた、443位にメチオニン以外のアミノ酸が存在する $\beta$ -ガラクトシダーゼの酵素アクセプターポリペプチド断片の新規な突然変異タンパク質を提供する。特に好ましいものはシステイン-76をロイシンまたはセリンで置換してある $\beta$ -ガラクトシダーゼの $\alpha$ アクセプターポリペプチド断片である。

さらに他の実施態様において、本発明はまた、76位にシステイン以外のアミノ酸が存在する $\beta$ -ガラクトシダーゼの酵素アクセプターポリペプチド断片の新規な突然変異タンパク質を提供する。特に好ましいものはメチオニン-443をロイシンで置換してある $\beta$ -ガラクトシダーゼの $\alpha$ アクセプターポリペプチド断片である。

1より多い置換を有する突然変異タンパク質も本発明によって提供されるが、こうした置換の少なくとも1つはアミノ酸位置500、443または76に存在しなければならない。

本発明の新規な突然変異タンパク質は著しく増大した活性（相補性活性と触媒活性の両方）をもつことが判明した。本発明の突然変異タンパク質または該突然変異タンパク質を含む賦薬組成物の安定性の有意な低下は見られないが、これら

の部位のいずれかのランダム突然変異誘発は活性と安定性の両方が向上した突然変異タンパク質をもたらす可能性がある。

さらに、これら新規な突然変異タンパク質を含有する試薬組成物、ならびに酵

素的に不活性のドナー断片とアクセプター断片との相補性を利用して酵素的に活性のある酵素を形成させることを含むクローニング化酵素ドナーイムノアッセイにおいて該組成物を用いるイムノアッセイ法を提供する。本発明の新規な酵素アクセプター突然変異タンパク質は、親酵素アクセプター断片と比べ、平衡活性および速度論的相補性活性の実質的向上を示すことが見いだされた。

本発明の新規な突然変異タンパク質は、親酵素アクセプターをコードする遺伝子上の適当な位置で部位特異的突然変異誘発を起こさせることにより作ることができる。部位特異的突然変異誘発法(Wallaceら, 1981, *Nucleic Acids Res.* 9, 3647-3656; Zoller and Smith, 1982, *Nucleic Acids Res.* 10, 6487-6500;および Deng and Nickoloff, 1992, *Anal. Biochem.* 200, 81-88)はβ-ガラクトシダーゼのシステイン-500、メチオニン-443またはシステイン-76の任意アミノ酸による置換を可能とする。ポリペプチド断片の化学合成は本発明の範囲を越えるものではない。しかし、こうした技法は一般にアミノ酸の長さが比較的に短いポリペプチドの製造に適用される。

本発明のアッセイでは、血清のようなサンプル中のアナライト(すなわち、リガンドまたは受容体)が酵素ドナーおよび酵素アクセプターポリペプチド断片を含有する試薬組成物を用いて定量される。その際、酵素ドナー断片はアナライトに特異的なアナライト結合性タンパク質に結合されており、また、アナライトは結合されたアナライト結合性タンパク質と交差反応性であるか、あるいはそれに相補的である。酵素アクセプターポリペプチドは本質的にβ-ガラクトシダーゼの断片から成り、この断片は上記の結合体に結合するアナライト結合性タンパク質の不在下で酵素ドナーと一緒にあってβ-ガラクトシダーゼ活性を有する活性酵素複合体を形成する点に特徴がある。これらの試薬をサンプルおよび適当なアッセイ媒体中で活性酵素複合体と反応し得る基質と組み合わせる。該酵素による基質の変換速度を、既知濃度のアナライトを用いて得られた基質の変換速度に対

比させて、サンプル中のアナライトの量を決定する。

#### 図面の簡単な説明

本発明は、本明細書の一部を構成する図面とともに考察するとき、以下の本発

明の詳細な説明を参照することにより一層理解されるであろう。

図1は、本発明の突然変異タンパク質EA45の速度論的 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性と親酵素アクセプターEA22の速度論的活性とを比較したグラフである。

図2は、本発明の突然変異タンパク質EA45の平衡 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性と親酵素アクセプターEA22の平衡活性とを比較したグラフである。

図3は、本発明の突然変異タンパク質EA33、EA34、EA51およびEA500Vの平衡 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性と親酵素アクセプターEA22の平衡活性とを比較したグラフである。

図4は、突然変異タンパク質EA45を用いた用量反応曲線であり、さまざまなレベルのアナライトに応答する再形成 $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素による基質変換の速度を示す。

#### 特定の実施態様の説明

本発明によると、酵素アクセプター断片をコードする遺伝子上の特定位置で突然変異を誘発させる部位特異的突然変異誘発法により $\beta$ -ガラクトシダーゼの新規な酵素アクセプターポリペプチド断片が作られる。本発明のある実施態様では、部位特異的突然変異誘発法を用いて天然配列の500位のシステインをコードする位置に突然変異を起こさせ、それによりシステインを同類アミノ酸で置換する。好ましいアミノ酸置換はバリンまたはセリンである。他のアミノ酸で置換してもよいが、同類置換が好適である。同類置換(conservative substitution)とは、類似した特性を有し、かつ酵素ドナーと相補する酵素アクセプターの能力または再形成された $\beta$ -ガラクトシダーゼの触媒活性に有害作用を及ぼさないようなアミノ酸による $\beta$ -ガラクトシダーゼのアミノ酸置換を意味する。このような同類アミノ酸置換の例として、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン、およびメチオニンがある。システインの特に好ま



しい置換はセリンまたはバリンであり、そして特に好ましい親酵素アクセプターは米国特許第4,708,929号に詳述されているE A 2 2である。

本発明の別の実施態様では、部位特異的突然変異誘発法を用いて天然配列の443位のメチオニンをコードする位置に突然変異を起こさせ、それによりメチオ

ニンを同類アミノ酸で置換する。特に好ましいアミノ酸置換はロイシンである。

本発明のさらに他の実施態様では、部位特異的突然変異誘発法を用いて天然配列の76位のシステインをコードする位置に突然変異を起こさせ、それによりシステインを同類アミノ酸で置換する。好ましいアミノ酸置換はロイシンまたはセリンである。他のアミノ酸で置換してもよいが、同類置換が好適である。

親酵素アクセプターはいろいろな組換えDNA法、例えば欠失構築または所望のアミノ酸配列を有するDNAの直接合成とこれに続く天然β-ガラクトシダーゼをコードするlacZ遺伝子のα領域のDNA配列へのインフレーム(in frame)連結、を用いて作ることができる。こうした技法は米国特許第4,708,929号に詳述されている。

また、親酵素アクセプターポリペプチド断片を産生する生物も一般に入手可能である。In Vitro International社 (IVI) (Ann Arbor, MI) の大腸菌株AMA 1004 (受託番号 10051) はアミノ酸13-40を欠失させたβ-ガラクトシダーゼ酵素アクセプター (E A 2 2) の遺伝子を担うプラスミドpMG 2 2を保有する。大腸菌株AMA 1004, IVI 10050 はアミノ酸30-37を欠失させたβ-ガラクトシダーゼ酵素アクセプター (E A 1 4) の遺伝子を担うプラスミドpMG 1 4を保有する。

本明細書で定義するとき、酵素アクセプターはβ-ガラクトシダーゼ遺伝子の欠失変異体により得られる酵素的に不活性のポリペプチドであり、酵素ドナーと組み合わせられるとき、相補的過程により酵素活性のあるβ-ガラクトシダーゼを形成する能力があるものである。ここで述べる置換された特定の酵素アクセプター突然変異タンパク質はE A 2 2から作られ、E A 2 2はβ-ガラクトシダーゼタンパク質のN末端をコードするβ-ガラクトシダーゼ遺伝子のα領域内に欠失を有する酵素アクセプターである。詳細には、E A 2 2はアミノ酸残基13-4

0の欠失を有する。また、アミノ酸位置500、443または76を含む天然配列を有するβ-ガラクトシダーゼの他の酵素アクセプター断片も、本発明の突然変異タンパク質を作るために使用することができる。酵素αアクセプターの特定の例は米国特許第4,708,929号に記述されており、例えばEA5、EA11、EA14、EA17、EA18、EA20、EA23およびEA24がある。適当

なαアクセプター中の欠失セグメントの遠位末端は通常、β-ガラクトシダーゼ配列のアミノ酸位置26-54の間にあるだろう。EA22においては、欠失セグメントの遠位末端がアミノ酸40である。

本明細書ではαアクセプター断片が例示されるが、さらに、ωアクセプター断片も本発明の範囲内である。ωアクセプターは欧州特許出願第92304354.1号に詳述されており、適当な親ωアクセプターの特定の例はOA721である。

本発明の教示にしたがって修飾のためにβ-ガラクトシダーゼの酵素アクセプターポリペプチドを選択する際に考慮すべき主な事柄は、所望の突然変異を起こそうとする位置、すなわち適宜にアミノ酸500、443または76のいずれかの位置に、欠失が前もって存在しないということである。

本明細書で定義するとき、酵素ドナーとは、2つのドメイン、すなわち酵素アクセプターと一緒に活性酵素を形成しうるタンパク質配列を含むドナードメインおよびアナライト結合性タンパク質と相互作用しうるアナライトドメイン、から成る酵素的に不活性のポリペプチドのことである。アナライトドメインは、(a)種々のアナライトまたはアナライト類似体との結合が行われるアナライト結合性ドメイン、または(b)それ自身がアナライト類似体として機能するタンパク質ドメイン、のいずれかである。特に好ましい酵素ドナーであるED4は米国特許第4,708,929号に詳述されている。

本発明のアッセイ法においては、対象アナライト（または類似のアナライト誘導体）を結合または融合させたβ-ガラクトシダーゼ系の酵素ドナー、つまり酵素ドナー結合体、の既知量を、既知量の特異的なアナライト結合性タンパク質または他の結合性分子および既知量の酵素アクセプター（酵素ドナーとの相補性を有する）と組み合わせる。酵素ドナー結合体のアナライトドメインとサンプル中

の遊離の未知アナライトの間で既知量の特異的なアナライト結合性タンパク質についての競合が起こって、酵素ドナー結合体が遊離の状態で存在するようになり、その結果、それが酵素アクセプターと会合する。ドナー結合体とアクセプターの会合は触媒活性のある酵素複合体の形成をもたらし、かくして、サンプル中で検出可能なβ-ガラクトシダーゼ酵素活性の量が変調される。結果的に、サンプル中の遊離アナライトが測定可能な酵素活性の直接的関数として定量される。酵素

活性は分光光度測定法および蛍光光度測定法を含むがこれらに限らない各種の技法を用いて酵素触媒反応による基質の変換速度をモニターすることにより測定される。

本明細書中で用いる速度論的活性は酵素アクセプターと酵素ドナーとの相補反応の速度および再形成されたβ-ガラクトシダーゼの触媒活性の両方を含むものである。平衡活性は酵素アクセプターと酵素ドナーとの相補が完結した後の再形成β-ガラクトシダーゼの触媒活性である。

#### 実施例1

##### 酵素アクセプター突然変異タンパク質EA500Vの構築

DengとNickoloffの方法(前掲)にしたがって、親αアクセプターEA22の部位特異的突然変異誘発により突然変異タンパク質EA500Vを構築した。EA22の構造遺伝子を含む出発プラスミドはp230であった。ハイブリダイゼーションのための連続した20の塩基および500位にシステインからバリンへの置換を導入する置換を含む2つのオリゴヌクレオチドプライマーを合成した。さらに、これらのプライマーはスクリーニングおよび選択の目的でそれぞれ新たな制限エンドヌクレアーゼ部位を組み入れ、かつ天然の制限エンドヌクレアーゼ部位を取り除いた。

変性したp230に2つのプライマーをアニーリングさせた後、それらをDNAポリメラーゼにより伸長させ、そしてエレクトロポレーションを使って鎖修復に欠陥のあるmut S. E. coli株 BMH 71-18に形質転換した。これらの細胞の一夜培養物から得られたプラスミドのプールをlacZ欠損株AMA 1004に再度形質転

換した。個々のコロニーから得られたプラスミドは新たなユニーク制限エンドヌクレアーゼ部位の導入についてスクリーニングした。陽性クローンはシステイン-500からバリンへの変化の導入について配列を解析した。最終的な突然変異誘発産物は、システイン-500の位置に突然変異誘発アミノ酸を有しかつ2つのサイレント変化（1つは突然変異誘発アミノ酸の近くにあり、1つはプラスミド上の他のユニーク部位位置にある）を含むプラスミド p 230 であった。

## 実施例 2

### 酵素アクセプター突然変異タンパク質 E A 4 5 の構築

Deng and Nickoloff の方法（前掲）にしたがって、親 α アクセプター E A 2 2 の部位特異的突然変異誘発により突然変異タンパク質 E A 4 5 を構築した。E A 2 2 の構造遺伝子を含む出発プラスミドは p 230 であった。ハイブリダイゼーションのための連続した20の塩基および443位にメチオニンからロイシンへの置換を導入する置換を含む2つのオリゴヌクレオチドプライマーを合成した。さらに、これらのプライマーはスクリーニングおよび選択の目的でそれぞれ新たな制限エンドヌクレアーゼ部位を組み入れ、かつ天然の制限エンドヌクレアーゼ部位を取り除いた。

変性した p 230 に2つのプライマーをアニーリングさせた後、それらを DN A ポリメラーゼにより伸長させ、そしてエレクトロポレーションを使って銅修復に欠陥のある mut S E. coli 株 BMR 71-18 に形質転換した。これらの細胞の一夜培養物から得られたプラスミドのプールを lac Z 欠損株 AMA 1004 に再度形質転換した。個々のコロニーから得られたプラスミドは新たなユニーク制限エンドヌクレアーゼ部位の導入についてスクリーニングした。陽性クローンはメチオニン-443からロイシンへの変化の導入について配列を解析した。最終的な突然変異誘発産物は、メチオニン-443の位置に突然変異誘発アミノ酸を有しかつ2つのサイレント変化（1つは突然変異誘発アミノ酸の近くにあり、1つはプラスミド上の他のユニーク部位位置にある）を含むプラスミド p 230 であった。

## 実施例 3

### 酵素アクセプター突然変異タンパク質 E A 5 1 の構築

挿入カセット突然変異誘発法を用いて酵素アクセプター突然変異タンパク質E A 5 1 を構築した。システイン-7 6 からロイシンへの変化を含む合成オリゴヌクレオチドをDNAポリメラーゼ Klenow 断片で酵素的に二本鎖となし、そして制限酵素で消化して、それを $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の7 6 位にクローン化させた。

#### 実施例 4

##### 酵素アクセプター突然変異タンパク質E A 3 3 およびE A 3 4 の構築

2つの出発プラスミドp 2 2 およびp 2 0 4 からE A 3 3 の構造遺伝子を含むプラスミドを誘導した。プラスミドp 2 2 はE A 2 2 をコードし、そしてp 2 0 4 は5 0 0 位と1 0 2 1 位に部位突然変異を有するプラスミドである。

p 2 0 4 の構築は所望の突然変異を有する2つのプラスミドp 2 0 1 およびp 2 0 2 を切断してつなげることにより行った。プラスミドp 2 0 1 はシステイン-1 0 2 1 をセリンに置換してあるプラスミドで、エキソヌクレアーゼIII/ブライミング法により作製された。すなわち、野生型 $\beta$ -ガラクトシダーゼの構造遺伝子をもつ出発プラスミドp 2 0 0 をユニーク制限部位で切断して線状化した。切断部位の3'末端鎖をエキソヌクレアーゼ IIIで時間依存的に消化し、さまざまな長さの一本鎖DNAを生成させた。突然変異誘発部位を一本鎖にした後、プライマーDNAを添加し、一本鎖鋳型にハイブリダイズさせた。これをDNAポリメラーゼ Klenow 断片、T 4 DNAリガーゼおよびDNAポリヌクレオチドキナーゼにより伸長させ、AMA 1004に形質転換した。正しい突然変異体は突然変異誘発プライマーにより挿入された制限部位の変化により検出した。プラスミドp 2 0 1 およびp 2 0 2 は標準的な遺伝子スプライシング法を用いて結合させた。その後、E A 2 2 欠失体を遺伝子スプライシングによりp 2 0 4 に移入して、E A 3 3 をコードするp 2 1 1 を作製した。

E A 3 4 を作るために、エキソヌクレアーゼ III法により生成した7 6 突然変異誘発部位をp 2 1 1 にスプライスして、E A 3 4 をコードするp 2 1 2 を作製した。

#### 実施例 5

# 速度論的活性および平衡活性の比較

酵素アクセプター突然変異タンパク質の速度論的および平衡活性を測定する、いくつかの比較実験を行った。これらの実験はすべて同一条件下で同時にを行ったわけではないので、得られた結果は1グループとして比較するためにEA22活性のパーセンテージとして以下の表に示す。

突然変異 タンパク質	突然変異	平衡活性 (EA22の%)	速度論的活性 (EA22の%)
EA22	親EA	100	100
EA33	cys 500→ser cys 1021→ser	159	123
EA34	cys 76→ser cys 500→ser cys 1021→ser	169	135
EA500V	cys 500→val	140	138
EA51	cys 76→leu	133	134
EA45	met 443→leu	117	323

## 実験1 (EA22、EA33、EA34)

速度論的活性を測定するために、50 mM リン酸ナトリウム、100 mM 塩化ナトリウム、2 mM EDTA、2 mM EGTA、5 mM 酢酸マグネシウム、3 mM ONPG (o-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド) および0.03% Tween-20 (ポリオキシエチレンソルビタンのICI Americas社の登録商標) を含む酵素アッセイ緩衝液 (pH7.0, 25°C) に5 μg の相応の酵素アクセプターと0.6 μg のED4を加え、この反応を405 nmでモニターした。15分の反応にわたる平均ΔA/minを活性の指標として用いた。1単位=平均ΔA/min×1000

平衡活性を測定するために、相応の酵素アクセプターとED4を0.1 mlの容量中それぞれ4.4 μM (0.5 mg/ml) および8.8 μMの最終濃度で室温にて24時間インキュベートした。10 μg/mlのEAに相当する希釈液25 μlを用いて、活性アッセイ緩衝液に加えることにより25°Cでβ-ガラクトシダーゼ活性を測定した。

1 単位の活性＝平均  $\Delta A / \text{min} \times 1000$

実験 2 (E A 2 2、E A 5 1、E A 5 0 0 V)

速度論的活性の測定は実験 1 のごとく行ったが、アッセイあたり  $3.75 \mu\text{g}$  の E A と  $0.45 \mu\text{g}$  の E D 4 を用いた。平衡活性を測定するために、E A の濃度を全容量  $0.09 \text{ ml}$  中  $0.22 \text{ mg/ml}$  ( $1.96 \mu\text{M}$ ) とし、E D 4 を  $3.67 \mu\text{M}$  とした。アッセイ

のために、 $8.8 \mu\text{g/ml}$  の E A に相当する希釈液  $20 \mu\text{l}$  を用いた。

実験 3 (E A 2 2、E A 4 5)

速度論的活性の測定は実験 1 のごとく行ったが、反応を 10 分間モニターした。平衡活性を測定するために、E A の濃度を全容量  $0.1 \text{ ml}$  中  $1 \text{ mg/ml}$  ( $8.8 \mu\text{M}$ ) とし、E D 4 を  $35.2 \mu\text{M}$  とした。インキュベーションを室温で 6 時間行った。アッセイのために、 $5 \mu\text{g/ml}$  の E A に相当する希釈液  $20 \mu\text{l}$  を用いた。

実施例 6

相補反応の速度の測定

酵素ドナー E D 4 を用いて、E A 4 5 から再形成された  $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素の速度論的活性と、「野生型」親 E A 2 2 から再形成されたものの活性とを比較した。

次の組成を有する活性アッセイ緩衝液を調製した。

50 mM リン酸 Na, pH 7.0

100 mM NaCl

5 mM 酢酸 Mg

2 mM エチレンジアミン四酢酸 (EGTA)

2 mM EDTA

0.03 % Tween-20

1 mg/ml CPRG (クロロフェニルレッド- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド)

速度論的  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の測定は、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの色素原基質 CPRG の存在下に  $0.3 \text{ nM}$  の  $\alpha$  ドナー E D 4 を含むアッセイ緩衝液中で  $300 \text{ nM}$  の相応の酵素アクセプターを用いて全容量  $1.0 \text{ ml}$  にて行った。次いで、その後の酵素活性の速度を 10 分間にわたり  $574 \text{ nm}$  での吸光度を  $25^\circ\text{C}$  でモニターすること

により分光光度的に測定した。得られた結果を図1に示す。

#### 実施例7

##### 平衡活性の測定

酵素ドナーED4を用いて、EA45から再形成された $\beta$ -ガラクトシダーゼ

酵素の平衡活性と、「野生型」親EA22から再形成されたものの活性とを比較した。

次の組成を有する活性アッセイ緩衝液を調製した。

50 mM リン酸Na, pH7.0  
100 mM NaCl  
5 mM 酢酸Mg  
2 mM EGTA  
2 mM EDTA  
0.03 % Tween-20  
3 mM ONPG

平衡活性の測定は、60 mM リン酸カリウム、400 mM 塩化ナトリウム、10 mM EGTA、2 mM 酢酸マグネシウム、20 mM アジ化ナトリウム、0.05% Tween-20を含む緩衝液(pH6.9)中で0.1  $\mu$ M の相応の酵素アクセプターと0.2  $\mu$ M の $\alpha$ ドナーED4をインキュベートすることにより行った。示した時点で、980  $\mu$ l のアッセイ緩衝液に20  $\mu$ l のインキュベーション混合物を加えた。次いで、その後の酵素活性のレベルを405 nmでの吸光度の変化率を測定することにより分光光度的に測定した。吸光度の変化/分 $\times$ 1000として得られた結果を図2に示す。

#### 実施例8

##### 平衡活性の比較

酵素ドナーED4を用いて、EA33、EA34、EA51およびEA500 Vの平衡活性を「野生型」親EA22の活性と比較した。

次の組成を有する活性アッセイ緩衝液を調製した。

50 mM リン酸Na, pH7.0  
100 mM 塩化ナトリウム



5 mM 酢酸Mg  
2 mM EGTA  
2 mM EDTA  
0.03 % Tween-20

3 mM ONPG

平衡活性の測定は、100 mM リン酸ナトリウム、2 mM EDTA、2 mM EGTA、5 mM 酢酸マグネシウム、0.02% アジ化ナトリウム、0.03% Tween-20を含む緩衝液 (pH 7.0) 中で0.1  $\mu$ M の相応の酵素アクセプターと0.2  $\mu$ M のED4を室温でインキュベートすることにより行った。示した時点で、980  $\mu$ l のアッセイ緩衝液に20  $\mu$ l のインキュベーション混合物を加えた。次いで、その後の酵素活性の速度を405 nmでの吸光度の変化率を測定することにより分光光度的に測定した。吸光度単位/分 $\times$ 1000として得られた結果を図3に示す。

#### 実施例9

##### バルビツール酸のアッセイ

サンプル検体中のアナライトを検出するEA45の能力を実証するために、さまざまな濃度のバルビツール酸用量 (セコバルビタール) を、アナライト結合性タンパク質としてバルビツール酸に特異的なモノクローナル抗体を用いて測定した。用量反応曲線をEA45について作成し、それを図4に示す。

##### EA試薬

100 mM PIPES (1,4- ピペラジンジエタンスルホン酸), pH 6.8  
600 mM NaCl  
10 mM 酢酸Mg  
10 mM EGTA  
20 mM アジ化Na.  
0.1 mg/ml EA45  
10 mM L-メチオニン  
0.5 % ウシ胎児血清  
希釈率 1:800のモノクローナルバルビツール酸抗体 (腹水)

#### E D 試薬

100 mM PIPES, pH 6.8

600 mM NaCl

10 mM EGTA

1 mM EDTA

20 mM アジ化Na

2 mg/ml ウシ血清アルブミン断片

1 mg/ml CPRG

0.93 nM ED28-セコバルビタール酸結合体

#### バルビタール酸の測定

等量の E D 試薬と E A 試薬を用いて Hitachi 717 自動アナライザ (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN) によりアッセイを行った。セコバルビタールの用量を E A 試薬に加えて 5 分間インキュベートし、その後 E D 試薬を加えた。E D 試薬の添加後 4' 00" - 5' 00" での 1 分の読取り間隔を用いて 570 nm で吸光度を測定した。この特定の実験では、用いた試薬の容量をそれぞれ 134  $\mu$ l とし、サンプルの容量を 9  $\mu$ l とした。用量は Alltech セコバルビタール校正物質 (10,000 ng/ml) から調製した。

【図1】

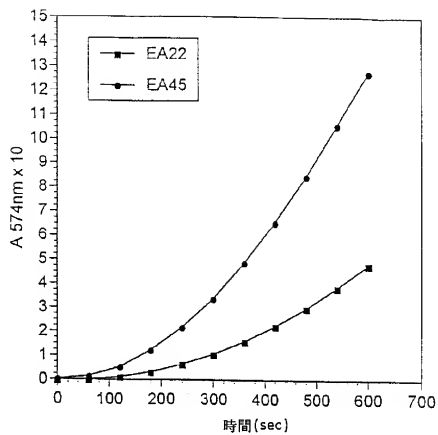


Fig. 1

【图2】

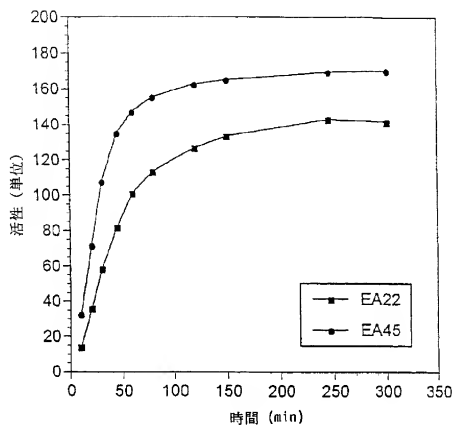


Fig. 2

【圖 3】

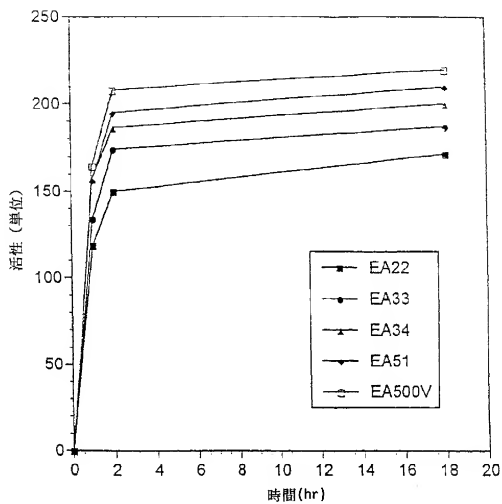


Fig. 3

【図4】

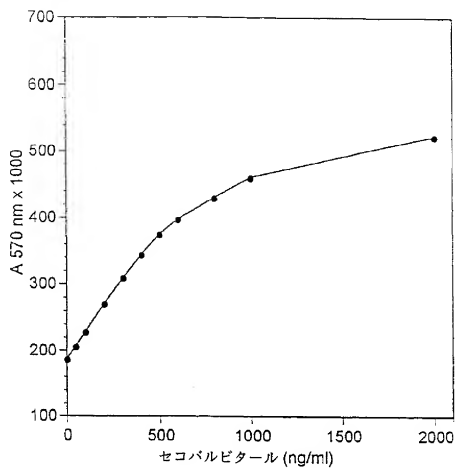


Fig. 4

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US94/12535

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : C12N 9/38, 15/52; C12Q 1/34; G01N 33/33  
US CL : 435/7.6, 18, 69.1, 172.1, 207

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 435/7.6, 18, 69.1, 172.1, 207

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US, A, 5,120,653 (HENDERSON) 09 JUNE 1992. See abstract; col 17, line 52-col. 18, line 9.	1-36

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	* Documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to undermine the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier documents published on or after the international filing date	"Y" documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" documents which may have disclosure on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Z" document number of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 11 JANUARY 1995	Date of mailing of the international search report JAN 27 1995
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer DAVID SAUNDERS, PRIMARY EXAMINER Telephone No. (703) 308-0194

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)w

(51)Int.Cl.<sup>6</sup> 識別記号 序内整理番号 F I  
C 1 2 R 1:19)

(72)発明者 クレヴォリン, マーク  
アメリカ合衆国 94564 カリフォルニア  
州 ビノール, デ ラ プライアンダイス  
コート 2732番地

(72)発明者 ボガスロースキー, ソフィー ジェイ.  
アメリカ合衆国 46260 インディアナ州  
インディアナポリス, サイカモア グロ  
ーブ コート 7580番地

(72)発明者 レデン, デイヴィッド ジェイ.  
アメリカ合衆国 46236 インディアナ州  
インディアナポリス, ベイ リッジ ド  
ライブ 7654番地